

1/5/3 (Item 3 from file: 351)  
DIALOG(R) File 351: Derwent WPI  
(c) 2006 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013507605

WPI Acc No: 2000-679549/200066

XRAM Acc No: C00-206693

**Lupin peptide extract having a metalloprotease inhibiting activity, for treatment of disorders due to excessive destruction of collagen or supporting macroproteins**

Patent Assignee: LAB EXPANSCIENCE (EXPA-N); LAB PHARMASCIENCE SA (PHAS )

Inventor: MSIKA P; PAUL F; PICCIRILLI A

Number of Countries: 023 Number of Patents: 013

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 200062789	A1	20001026	WO 2000FR1007	A	20000418	200066 B
FR 2792202	A1	20001020	FR 994875	A	19990419	200066
EP 1171143	A1	20020116	EP 2000920831	A	20000418	200207
			WO 2000FR1007	A	20000418	
KR 2002030263	A	20020424	KR 2001713229	A	20011017	200269
JP 2002542199	W	20021210	JP 2000611925	A	20000418	200301
			WO 2000FR1007	A	20000418	
US 20040101580	A1	20040527	WO 2000FR1007	A	20000418	200435
			US 2001958092	A	20011116	
			US 2003678884	A	20031003	
EP 1171143	B1	20041020	EP 2000920831	A	20000418	200469
			WO 2000FR1007	A	20000418	
DE 60015112	E	20041125	DE 15112	A	20000418	200477
			EP 2000920831	A	20000418	
			WO 2000FR1007	A	20000418	
EP 1171143	B9	20050316	EP 2000920831	A	20000418	200520
			WO 2000FR1007	A	20000418	
ES 2228500	T3	20050416	EP 2000920831	A	20000418	200528
US 20050148498	A1	20050707	WO 2000FR1007	A	20000418	200547
			US 2001958092	A	20011116	
			US 2004985988	A	20041112	
DE 60015112	T2	20060202	DE 15112	A	20000418	200619
			EP 2000920831	A	20000418	
			WO 2000FR1007	A	20000418	
US 7029713	B2	20060418	US 2000958092	A	20000418	200627
			WO 2000FR1007	A	20000418	
			US 2003678884	A	20031003	

Priority Applications (No Type Date): FR 994875 A 19990419

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

WO 200062789	A1	F	36	A61K-035/78	
--------------	----	---	----	-------------	--

Designated States (National): BR JP KR US

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

FR 2792202	A1			A61K-035/78	
------------	----	--	--	-------------	--

EP 1171143	A1	F		A61K-035/78	Based on patent WO 200062789
------------	----	---	--	-------------	------------------------------

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

KR 2002030263	A			A61K-035/78	
---------------	---	--	--	-------------	--

JP 2002542199	W		45	A61K-035/78	Based on patent WO 200062789
---------------	---	--	----	-------------	------------------------------

US 20040101580	A1			A61K-035/78	Div ex application WO 2000FR1007
----------------	----	--	--	-------------	----------------------------------

Div ex application US 2001958092

EP 1171143	B1	F		A61K-035/78	Based on patent WO 200062789
------------	----	---	--	-------------	------------------------------

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

DE 60015112	E			A61K-035/78	Based on patent EP 1171143
-------------	---	--	--	-------------	----------------------------

Based on patent WO 200062789

EP 1171143	B9	F		A61K-035/78	Based on patent WO 200062789
------------	----	---	--	-------------	------------------------------

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

ES 2228500	T3			A61K-035/78	Based on patent EP 1171143
------------	----	--	--	-------------	----------------------------

US 20050148498	A1			A61K-038/16	Cont of application WO 2000FR1007
----------------	----	--	--	-------------	-----------------------------------

Cont of application US 2001958092

DE 60015112 T2 A61K-035/78 Based on patent EP 1171143  
US 7029713 B2 A61K-035/78 Based on patent WO 200062789  
Div ex application US 2000958092  
Div ex application WO 2000FR1007

Abstract (Basic): WO 200062789 A1

NOVELTY - Lupin peptide extract having a metalloprotease inhibiting activity is new.

DETAILED DESCRIPTION - The extract is preferably low in lipids and contains at least 50%, preferably at least 80% of peptides. It is obtained by hydrolysis of the lupin proteic fraction.

ACTIVITY - Antiarthritic; Antiinflammatory; Dermatological; Cytostatic.

MECHANISM OF ACTION - Metalloprotease inhibitor; Collagenase inhibitor; Gelatinase inhibitor.

A composition containing 0.04% of lupin extract inhibited 52% of the gelatinolytic activity of Clostridium collagenase when incubated for 2 hours, and inhibited 93% when incubated for 24 hours.

USE - Pharmaceutical, cosmetic and nutrient compositions containing the extracts are claimed. Used for treatment of disorders due to excessive destruction of collagen or supporting macropoteins due to metalloproteases. Such disorders include arthroses, periodontal diseases, skin lesions, inflammatory disorders, disorders due to defective cicatrization, dental enamel attack, and tumoral or pathological angiogenesis. It may also be used to treat skin aging, whether due to intrinsic causes, due to solar radiation, the deleterious effects of tobacco, pollution, or stress.

pp; 36 DwgNo 0/1

Title Terms: LUPIN; PEPTIDE; EXTRACT; INHIBIT; ACTIVE; TREAT; DISORDER; EXCESS; DESTROY; COLLAGEN; SUPPORT

Derwent Class: B04; D13; D21

International Patent Class (Main): A61K-035/78; A61K-038/16

International Patent Class (Additional): A23L-001/30; A23L-001/305;

A61K-007/00; A61K-007/26; A61K-007/48; A61K-038/00; A61K-038/55;

A61K-038/56; A61P-001/00; A61P-001/02; A61P-009/00; A61P-009/14;

A61P-017/00; A61P-017/02; A61P-017/16; A61P-019/00; A61P-019/02;

A61P-029/00; A61P-035/00; A61P-039/00; A61P-043/00; C07K-014/415;

C07K-014/42; C12N-009/99

File Segment: CPI

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 792 202**

②① N° d'enregistrement national : **99 04875**

⑤① Int Cl<sup>7</sup> : A 61 K 35/78, A 61 K 38/56, 7/48, A 61 P 17/00

①②

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

**A1**

②② Date de dépôt : 19.04.99.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 20.10.00 Bulletin 00/42.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : LABORATOIRES PHARMASCIENCE  
*Société anonyme — FR.*

⑦② Inventeur(s) : MSIKA PHILIPPE, PICCIRILLI  
ANTOINE et PAUL FRANCOIS.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ EXTRAIT PEPTIDIQUE DE LUPIN ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE OU COSMETIQUE OU  
NUTRACEUTIQUE COMPRENANT UN TEL EXTRAIT.

⑤⑦ La présente invention concerne un extrait peptidique  
de lupin (*lupinus*), notamment *Lupinus albus*, caractérisé en  
ce qu'il présente une activité d'inhibition des métalloprotéa-  
ses, notamment les collagénases et les gélatinases.

Elle concerne également une composition pharmaceuti-  
que, cosmétique ou nutraceutique comprenant un extrait  
peptidique, éventuellement un véhicule inerte, notamment  
pour le traitement d'humains ou de mammifères souffrant  
d'une condition ou d'une maladie liée à une dégradation ex-  
cessive ou pathologique du collagène ou d'une autre  
macroprotéine extracellulaire de soutien par une métallo-  
protéase.

FR 2 792 202 - A1



La présente invention est relative à un nouvel extrait peptidique présentant une activité anti-métalloprotéase, notamment anti-collagénase et anti-gélatinase. Elle est également relative aux compositions pharmaceutiques, cosmétiques ou nutraceutiques comprenant un tel extrait, notamment une composition  
5 pharmaceutique destinée à traiter les maladies inflammatoires, telles que l'arthrose, la parodontose, ou les ulcères ou les compositions cosmétiques destinées à combattre le vieillissement actinique ou non ou accéléré par les agressions extérieures (tabac, pollution, ...).

La composition pharmaceutique ou cosmétique ou nutraceutique est  
10 également destinée à traiter la néoangiogénèse (prolifération des vaisseaux) pathologique ou inesthétique (psoriasis, tumeurs, érythrose, couperose, rosacée, traitement local aux irritants tels que l'acide rétinolique), les défauts de cicatrisation, les brûlures ou l'attaque d'émail dentaire (Ch. M. Lapiere, Cours de biologie de la peau – COBIP INSERM U 346, Lyon 1999).

15 Les métalloprotéases sont une famille d'endopeptidases zinc et calcium-dépendantes qui ont la propriété combinée de dégrader les divers composants des matrices du tissu conjonctif (Thèse de S. Charvat – Métalloprotéinases et épiderme, pages 101-113 n° 248-98, 1998, Lyon I).

Elles sont classées suivant la nature de leur substrat. La collagénase (le  
20 collagène fibrillaire : ex. MMP 1, 13, 8) ; la gélatinase (le collagène dénaturé, gélatine : ex. MMP2, MMP9) ; les stromélysines (fibronectine, protéoglycane : ex. MMP3, MMP10). Elles sont mises en jeu dans le remodelage physiologique (faible expression) ou pathologique de la matrice extracellulaire (forte induction).

Les métalloprotéases sont notamment impliquées dans le processus de  
25 cicatrisation en éliminant les tissus endommagés.

Les MMP peuvent agir de façon anarchique et conduire à des lésions importantes si leur activité n'est pas contrôlée.

Par ailleurs, on sait que les métalloprotéases sont impliquées dans certains désordres biologiques tels que les maladies inflammatoires, notamment l'arthrose, la  
30 parodontose (H. BIRKEDAL-HANSEN et al., Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 4(2) :197-250 (1993)) ou dans les processus de vieillissement, notamment liés à l'action du rayonnement solaire (MARTIN RIEGER ; Allured's Cosmetics & Toiletries®, vol. 114, No. 1/January 1999 ou G. J. FISHER et al., The New England Journal of Medicine, vol. 337, n° 20 pp. 1419-1428,

- « Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light » et G. J. FISHER et al., the Society for Investigative Dermatology, Inc. 1998, pp. 61-68 « Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid : ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce
- 5 A-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. ») ou dans les inflammations aiguës et chroniques (XIE et al. ; J. Biol. Chem. 273 : pp. 11576-11582 ; 1998) et les maladies bulleuses (nécrolyse épithéliale toxique), les pathologies à hyper prolifération cellulaire lors d'inflammation ou d'irritation, les escarres, les brûlures et les ulcères.
- 10 Il en est de même pour la prolifération des cellules endothéliales néoangiogénèses qui ont besoin dans leur phase proliférative lors de processus inflammatoires ou pathologiques (psoriasis, tumeurs) des MPP pour détruire le tissu conjonctif, afin de migrer vers d'autres territoires et de se constituer en microtubules et capillaires (Controlling the vasculature : angiogenesis, anti-
- 15 angiogenesis and vascular targeting of gene therapy – T.P. D. FAN, R. JAGGAR et R. BICKNELL ; TiPS – February 1995, vol. 16 ; Natural Products as angiogenesis inhibitors, D.H. PAPER, Planta Medica 64 (1998) pp. 686-695 ; Membrane-type matrix metalloproteinases in human dermal microvascular endothelial cells : expression and morphogenetic correlation – V.T. CHAN et coll. , J.I.D. 111, pp.
- 20 1153-1159, 1998 ; Matrix metalloproteinases in blood vessel development in human fetal skin and in cutaneous tumors – T.V. KARELINA et coll. J.I.D. ; 105, 411-417, 1995 ; Vascular proliferation and angiogenic factors in psoriasis, J.D. CREAMER et J.N.W.N. BARKER, Clinical and Experimental Dermatology, 1995, 20, pp. 6-9).

On connaît également le rôle des inhibiteurs de métalloprotéases,

25 notamment les collagénases, les gélatinases et stromélysines, dans certains des traitements des maladies précitées.

L'objet de la présente invention est de proposer un nouvel inhibiteur à spectre large des métalloprotéases de type collagénase, gélatinase permettant le traitement d'humains ou de mammifères souffrant d'une condition ou d'une

30 maladie liée à une dégradation excessive ou pathologique du collagène ou d'une autre macroprotéine extracellulaire de soutien ou tout autre maladie liée à un excès d'expression de ces enzymes protéolytiques.

L'invention a pour objet un extrait peptidique de lupin (*lupinus*) caractérisé en ce qu'il présente une activité d'inhibition des métalloprotéases, notamment les

collagénases ou les gélatinases. Comme variété de lupin, on cite notamment le genre lupin blanc doux (*lupinus albus*) tel que la variété Ares de faible teneur en alcaloïdes.

5 L'invention a notamment pour objet un nouvel extrait peptidique de lupin (*lupinus*) caractérisé en ce qu'il présente une activité d'inhibition de la collagénase purifiée de *Clostridium histolyticum* sur la DQ-gélatine notamment supérieure à 50% à 24 heures, pour une concentration égale ou supérieure à 0,1 % (p/v).

Selon une variante, cet extrait peptidique de lupin est appauvri en lipide.

10 Il comprend de préférence au moins 70 %, de préférence au moins 80 % de peptide.

Ces peptides sont obtenus par hydrolyse de la fraction protéique de lupin.

L'hydrolyse peut être effectuée par n'importe quel moyen approprié, notamment une hydrolyse enzymatique.

15 Un procédé de préparation d'un tel extrait peptidique de lupin comprend les étapes suivantes :

- préparation d'un tourteau de lupin délipidé et broyé ou d'une farine de lupin (lipidée) micronisée,,
- extraction des fractions protéiques et osiques solubles ou précipitation à pH acide (4 ou 5) selon le point isoélectrique,
- 20 - éventuellement séparation de la fraction protéique,
- hydrolyse de la fraction protéique et récupération, éventuellement après filtration, de l'extrait protéique.

L'invention est également relative à l'extrait protéique susceptible d'être obtenu par le procédé précité.

25 De façon générale, l'invention comprend les farines de lupin lipidées, les extraits peptidiques comprenant encore les sucres.

De préférence, l'extrait protéique présente la composition en acides aminés suivante (pourcentage en poids par rapport au poids total d'acides aminés).

Amino-acides	%/AA totaux
ASP	11,3
GLU	23,2
SER	5,1
HIS	1,7
GLY	3,4
THR	3,2
ALA	2,8
ARG	10,3
TYR	6,1
CYS-CYS	2,4
VAL	3,8
MET	0,2
PHE	7,0
ILE	3,3
LEU	7,9
LYS	3,7
PRO	4,4

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique ou cosmétique ou nutraceutique comprenant un extrait peptidique tel que décrit précédemment, éventuellement un véhicule inerte approprié, physiologiquement acceptable.

Une telle composition pharmaceutique ou dermocosmétique et nutraceutique est destinée notamment au traitement d'humains ou de mammifères souffrant d'une condition ou d'une maladie liée à une destruction excessive de collagène et/ou une destruction excessive des tissus de soutien. Une telle composition peut être utilisée à titre préventif ou curatif.

Parmi ces conditions ou maladies, on cite par exemple l'arthrose, les maladies parodontales, les maladies liées aux lésions de la peau, les maladies inflammatoires, la néangiogénèse tumorale ou pathologique (érythrose, couperose,

télangectasie, rosacée, psoriasis ...) défaut de cicatrisation, ulcères, brûlures, maladies bulbeuses, attaque de l'émail dentaire.

5 L'invention est également relative aux compositions cosmétiques pour le traitement des lésions de la peau dues au vieillissement telles que les lésions provoquées par l'action du rayonnement solaire (en anglais photoaging), les effets délétères intrinsèques de la peau, les effets délétères du tabac.

Les compositions pharmaceutiques, dermocosmétiques ou cosmétiques se présentent, selon une variante, sous la forme d'une formulation pour application topique. L'invention a donc pour objet une méthode de traitement cosmétique  
10 comprenant l'application d'une telle composition sur la surface cutanée d'un individu.

L'extrait peptidique selon l'invention peut également être incorporé ou formulé dans un véhicule polymérique ou un système de délivrance pour une utilisation topique ou locale, comme dans le cas du traitement d'une maladie  
15 parodontale, pour être délivré directement dans la poche parodontale.

Selon une autre variante, les compositions pharmaceutiques sont sous la forme d'une formulation pour administration orale.

Ces compositions peuvent en général être formulées sous la forme de tablettes, de capsules, de pommade.

20 Dans le cas des nutraceutiques ou composition alimentaire, les formes habituellement utilisées peuvent être employées.

L'invention est maintenant illustrée par les exemples de réalisation décrits ci-après à titre illustratif.

## I – Préparation des extraits peptidiques de lupin

### I.1. – Extrait A

- Extraction et purification des protéines de lupin

Cette étape comprend une solubilisation aqueuse de la fraction soluble à pH  
5 alcalin suivie d'une séparation des insolubles :

A partir du tourteau de lupin délipidé et broyé, l'extraction des protéines est réalisée à pH 9,0 (pH ajusté par ajout de soude) avec un ratio farine/eau égal à 1/10 (p/p). La solution est incubée sous agitation à température ambiante pendant une heure. La partie insoluble du tourteau est ensuite séparée de la partie soluble par  
10 essorage. Le gâteau obtenu est lavé. La fraction soluble contenant les protéines et les sucres solubles est diafiltrée sur un module d'ultrafiltration de seuil de coupure de 10.000 daltons afin de séparer les protéines (rétentat) des sucres solubles (ultrafiltrat).

- Production et purification de peptides par hydrolyse enzymatique :

15 Le rétentat d'ultrafiltration contenant les protéines est ajusté à la concentration de 100 g/l puis hydrolysé à pH 8,0 en présence d'Alcalase® (NOVO NORDISK) à 55°C pendant 3 h environ. Après hydrolyse, l'enzyme est dénaturée par hydrolyse pendant 15 min à 85°C. Dès que la solution est refroidie, elle est neutralisée par ajout d'acide chlorhydrique. Les peptides obtenus sont purifiés par  
20 diafiltration sur module d'ultrafiltration de seuil de coupure de 10.000 daltons. La solution obtenue est ensuite nanofiltrée afin de dessaler (élimination du chlorure de sodium) et de concentrer la fraction peptidique. La solution de peptides est enfin décolorée à l'aide de charbon actif 3 % (1 heure à 50 °C), le charbon étant éliminé par filtration.

- 25 - Stérilisation et conditionnement de la fraction de peptides:

Avant conditionnement, la solution est microfiltrée (0,2 µm) de façon stérile puis répartie dans des contenants stériles à la concentration de 10 % en présence de conservateurs.

### 30 I.2 – Extrait B

L'extrait peptidique B est obtenu selon le procédé décrit mis en œuvre pour obtenir l'extrait A à la différence que l'étape de décoloration est supprimée.

### I.3 – Extrait C

L'extrait peptidique de lupin C est obtenu selon le procédé décrit mis en œuvre pour obtenir l'extrait A à la différence que les étapes de purification d'ultrafiltration et de décoloration sont supprimées.

5

### II – Analyse de l'extrait peptidique A

L'extrait sec est ensuite analysé.

Présentation :

- Aspect : poudre homogène non hygroscopique
- 10 - Couleur : blanc cassé
- Quantité : 5 g
- Composition chimique :
  - Teneur en sucres totaux (dosage à l'anthrone) : < 1 %
  - Teneur en chlorures (Kit SIGMA réf : 955-30) : 6 %
  - 15 - Teneur en eau (100 °C, 4 h) : 8 % maximum
  - Teneur en peptides : 85 %
- caractérisation
  - pH (solution à 20 g/l): 7,06
  - Solubilité (eau osmosée) : >100 g/l

Tableau 1 - Composition en acides aminés de l'hvdrolysat

Amino-acides	P.M. A.A.	Conc. en mM	Conc. en mg/l	% dans poudre	%/AA totaux
ASP	133,1	2,078	276,582	9,9	11,3
GLU	147,1	3,858	567,438	20,3	23,2
SER	105,1	1,196	125,647	4,5	5,1
HIS	155,2	0,270	41,904	1,5	1,7
GLY	75,1	1,114	83,624	3,0	3,4
THR	119,1	0,664	79,023	2,8	3,2
ALA	89,1	0,763	67,983	2,4	2,8
ARG	174,2	1,447	251,980	9,0	10,3
TYR	181,2	0,829	150,215	5,4	6,1
CYS-CYS	240,3	0,247	59,234	2,1	2,4
VAL	117,1	0,792	92,743	3,3	3,8
MET	149,2	0,029	4,327	0,2	0,2
PHE	165,2	1,044	172,469	6,2	7,0
ILE	131,2	0,621	81,410	2,9	3,3
LEU	131,2	1,481	194,307	6,9	7,9
LYS	146,2	0,626	91,448	3,3	3,7
PRO	115,1	0,935	107,619	3,8	4,4

2447,952

Total

87,4 %

5

III – Activité anti-collagénase et anti-gélatinolytique des peptides de lupin - extraitA -in vitro

10 L'activité anti-collagénase a été mesurée *in vitro* dans un modèle biochimique de type screening reposant sur l'utilisation d'une collagénase purifiée et du substrat de cette dernière, la gélatine conjuguée à la fluorescéine (kit EnzChek™ Gelatinase/Collagenase, MOLECULAR PROBES). La collagénase purifiée à partir de *Clostridium histolyticum* était fournie dans le kit EnzChek™ Gelatinase/Collagenase (MOLECULAR PROBES). Cette enzyme a une double fonctionnalité sur le collagène IV (membrane basale épiderme/ derme) et gélatine.

La DQ-gélatine purifiée à partir de peau porcine et conjuguée à la fluorescéine était fournie dans le kit EnzChek™ Gelatinase/Collagenase (MOLECULAR PROBES).

Le tampon de la réaction, constitué de 0,05 M de Tris-HCl, de 0,15 M NaCl, de 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, de 0,2 mM d'azide de sodium (pH 7,6), était fourni dans le kit EnzChek™ Gelatinase/Collagenase (MOLECULAR PROBES).

L'extrait peptidique a été solubilisé dans le tampon de la réaction. Il a été testé à 0,004 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,2 et 0,4 % (p/v).

Les dilutions des extraits à l'essai ont été incubées avec la DQ-gélatine à 1 mg/ml et la collagénase à 0,2 UI/ml pendant 1 heure, 2 heures et 24 heures à température ambiante.

Un témoin, correspondant au mélange « collagénase + DQ-gélatine », a été incubé en parallèle.

Pour chaque condition expérimentale, des échantillons, appelés par la suite « échantillons sans enzyme », ont été incubés en présence de DQ-gélatine et en absence de collagénase.

Chaque condition expérimentale a été réalisée en triplicate.

Après 1 heure, 2 heures et 24 heures, le signal correspondant à la dégradation de la DQ-gélatine a été mesurée en fluorimétrie (Excitation : 485 nm et émission : 595 nm). Pour chaque échantillon, la valeur obtenue pour les « échantillons sans enzyme » a été soustraite.

Les résultats ont été exprimés en unité de fluorescence par échantillon et en pourcentage de variation par rapport au groupe témoin.

Les groupes de données (groupe témoin et groupes traités) ont été comparés par une analyse de la variance à un facteur (ANOVA 1,  $p < 0,05$ ), suivie par un test de Dunnett. L'effet des extraits a ainsi été comparé à celui obtenu dans le groupe témoin.

L'extrait peptidique testé de 0,004 à 0,2% (p/v), présentait une activité anti-collagénase et anti-gélatinolytique dose-dépendante. L'effet était maximum au temps 24 heures comme indiqué dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2

Temps d'incubation = 1 heure

Témoin	0,004	0,02	0,04	0,2	0,4
16237	14161	11890	11205	11249	9434
14329	13561	11161	10863	9840	7544
15636	13965	11757	11344	11387	8878
15401	13896*	11603*	11137*	10825*	8619*
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
976	306	388	248	856	971
100 %	89	75	73	73	57

5 Temps d'incubation = 2 heures

Témoin	0,004	0,02	0,04	0,2	0,4
24776	20526	13689	11000	7617	6853
22516	19597	6710	10406	6072	4933
23779	20144	13148	11349	7824	6467
23690	20089*	11182*	10918*	7171*	6084*
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
1133	467	3883	477	957	1016
100 %	85	55	48	33	27

Temps d'incubation = 24 heures

Témoin	0,004	0,02	0,04	0,2	0,4
31653	12655	2583	2378	524	1154
29536	11531	1487	1442	484	467
29745	13008	2657	2713	693	927
30311	12398*	2242*	2178*	567*	849*
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
1167	771	655	659	111	350
100 %	41	7	7	2	3

Les résultats sont exprimés en unité de fluorescence/échantillon.

En gras : moyenne et écart type

\* : moyenne significativement différente du groupe témoin ( $p < 0,05$ ).

- En conclusion, dans les conditions expérimentales retenues, l'extrait
- 5 protéique testé entre 0,004 et 0,4 % (p/v), présentait une activité anti-gélatinase/collagénase dose-dépendante. On note notamment un excellent rapport effet/dose/temps des peptides de lupin par rapport à la collagénase aspécifique : à 24 heures par exemple, 0,04 % inhibe 93 % de l'activité gélatinolytique de la collagénase de *Clostridium*, à 2 heures : 52 %.
- 10 D'autres essais avec le même extrait peptidique ont été effectués à des concentrations de 0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 et 1 % (p/v) et les résultats sont indiqués au tableau 3 ci-dessous ainsi que sur la figure annexée. Cette figure représente la cinétique d'inhibition de la collagénase aspécifique – Influence de la concentration en extrait peptidique. En ordonnée activité de la gélatinolytique (%), en abscisse
- 15 temps d'incubation (h).

Tableau 3

Temps d'incubation (h)	Concentration en extrait A (% p/v)/Activité gélatinolytique en (%)				
	0,01	0,05	0,1	0,5	1
1	89	75	73	73	57
2	85	55	48	33	27
4	79	38	29	14	12
6	69	27	21	8	9
24	41	7	7	2	3

- Dans les conditions expérimentales retenues, l'extrait peptidique testé entre 0.01 et 0.5 % (p/v), présente une activité anti-gélatinase et collagénase dose
- 20 dépendante et temps dépendante.

Dans tous les essais, la 1,10-phénanthroline inhibiteur aspécifique a été utilisée comme produit anti MMP de référence. Les résultats obtenus étaient conformes à ceux qui étaient attendus et validaient les essais.

IV – Activité anti-collagénase spécifique des peptides de lupin – extrait A- sur modèle organotypique humain

Le vieillissement cutané se caractérise, entre autre, par une modification des propriétés mécaniques cutanées de la peau, consécutive à une dégradation des fibres collagéniques du derme et d'autres macroprotéines. Cette dégradation met en jeu des collagénases endogènes (Grymes, R.A., Kronberger A. and Bauer E.A. – Collagenases in disease – In « Connective Tissue Diseases of the skin » Eds. Lapière C.M. and Krieg T., 1993, 69-85). G. Fischer et J. Voorhees « Pathiophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light » et « Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid : ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce A-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo »).

Pour lutter contre les signes de vieillissement de la peau, des produits présentant une activité anti-collagénase sont envisageables.

L'activité anti-collagénase d'un produit à l'essai peut être étudiée *in vitro* dans un modèle organotypique de peau humaine. Le principe du test est le suivant : une application de collagénase purifiée sur la coupe s'accompagne d'une dégradation des fibres de collagène endogènes. Les fibres de collagène sont ensuite colorées par le trichrome de Masson. La digestion des fibres de collagène endogènes par la collagénase purifiée est évaluée qualitativement par observation morphologique et quantitativement par analyse d'images. Un produit présentant une activité anti-collagénase préservera partiellement ou totalement l'intégrité des fibres de collagène mises en présence de l'enzyme.

Les produits à l'essai ont été conservés à +4 °C jusqu'au moment de leur utilisation.

Trois dilutions ont été testées : 0,01 ; 0,1 et 1 % (v/v).

Le phosphoramidon, utilisé comme produit de référence, provenait de chez SIGMA.

La collagénase purifiée (type III, fraction A) provenait de chez SIGMA.

Le milieu d'incubation des coupes de peau humaine, appelé par la suite "véhicule", était le tampon Tris HCl 0,15 M, pH 7,5 contenant 0,01 M de chlorure de calcium.

Les réactifs, de qualité analytique, provenaient de chez CARLO ERBA, GIBCO ou SIGMA, sauf indication contraire.

Les coupes de peau ont été réalisées à partir d'un déchet opératoire recueilli après une plastie abdominale. Le sujet était une femme de 30 ans. Des explants de  
5 peau de 4 cm de diamètre ont été réalisés. Ils ont été déposés sur un support de liège et congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Des coupes transverses de  $6\text{ }\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées avec un cryomicrotome. Elles ont été fixées sur des lames de verre et maintenues hydratées avec le véhicule pendant l'essai.

Les échantillons à l'essai ont tous été repris dans de l'éthanol avant d'être  
10 dilués dans le tampon d'essai.

- La concentration finale en éthanol a été maintenue constante et égale à 0,1 % (v/v) dans les deux plus faibles dilutions de l'extrait peptidique (0,01 et 0,1 % v/v) ;
- elle a été maintenue constante et égale à 1 % (v/v) dans la dilution la  
15 plus forte (1 %, v/v).
- Des "témoins éthanol" à 0,1 et 1 % (v/v) ont été réalisés.
- Le phosphoramidon a été repris directement dans le véhicule.

L'extrait peptidique a été testé à 0,01 ; 0,1 et 1 % (p/v).

Le phosphoramidon a été testé à  $10^{-3}\text{ M}$ .

20 On avait donc les échantillons suivants :

Extrait : tampon ; éthanol (0,1 %, v/v ou 1 %, v/v) ; enzyme extrait (0,01 ; 0,1 et 1 %, p/v) ;

Témoin enzyme : tampon ; éthanol (0,1 %, v/v) ; enzyme ;

Témoin éthanol (sans enzyme) : tampon ; éthanol (0,1 % ou 1 %, v/v) ;

25 Produit réf : tampon ; éthanol ; enzyme ; phosphoramidon  $10^{-3}\text{ M}$ .

Les dilutions des produits à l'essai, de l'éthanol et du produit de référence ont été déposées sur les coupes de peau, à raison de  $100\text{ }\mu\text{l}$  par coupe, et pré-incubées pendant dix minutes à  $37^{\circ}\text{C}$ . Des bandes de papier filtre ( $0,16\text{ cm}^2$  de surface) imbibées de véhicule seul (témoin sans enzyme) ou contenant de la  
30 collagénase à 50 unités internationales (UI)/ml (témoin enzyme) ont ensuite été déposées sur les coupes. Les lames ont été placées en chambre humide à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant trois heures.

Après l'incubation, les coupes ont été rincées avec le milieu d'incubation et colorées par le trichrome de Masson. L'activité de l'enzyme en absence et en présence de l'extrait, de l'éthanol ou du produit de référence a été évaluée par observation microscopique et notée selon le barème suivant :

- 5                    0 : digestion enzymatique nulle  
                       + : digestion enzymatique faible  
                       ++ : digestion enzymatique moyenne  
                       +++ : digestion enzymatique forte.

Des photographies des coupes ont été réalisées.

- 10                  L'activité de la collagénase en absence et en présence des produits à l'essai, de l'éthanol ou du produit de référence a été évaluée par analyse d'images. L'image des coupes colorées a été digitalisée sur un écran vidéo; le logiciel d'analyse d'image (IMAGENIA 2000, BIOCROM®) a permis de calculer la surface occupée par les fibres de collagène intactes. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de
- 15 fibres de collagène intactes par champ optique.

Le pourcentage d'inhibition de l'activité collagénase des extraits à différentes concentrations de l'éthanol et du produit de référence a été calculé à l'aide des formules suivantes :

- 20                  Pour le produit de référence (directement repris dans le véhicule), le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante :
- $$\frac{(\% \text{ fibres collagène})_{\text{Produit Réf}} - (\% \text{ fibres collagène})_{\text{Témoin enzyme}}}{(\% \text{ fibres collagène})_{\text{Témoin éthanol}} - (\% \text{ fibres collagène})_{\text{Témoin enzyme}}} \times 100$$

- 25                  Pour les extraits dilués dans le véhicule contenant 0,1 % (v/v) d'éthanol, le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante :
- $$\frac{(\% \text{ fibres collagène})_{\text{Produit Réf}} - (\% \text{ fibres collagène})_{\text{Témoin enzyme}}}{(\% \text{ fibres collagène})_{\text{Témoin éthanol}} - (\% \text{ fibres collagène})_{\text{Témoin enzyme}}} \times 100$$

- 30                  Pour les extraits dilués dans le véhicule contenant 1 % (v/v) d'éthanol, le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante :
- $$\frac{(\% \text{ fibres collagène})_{\text{Produit Réf}} - (\% \text{ fibres collagène})_{\text{Témoin enzyme}}}{(\% \text{ fibres collagène})_{\text{Témoin éthanol}} - (\% \text{ fibres collagène})_{\text{Témoin enzyme}}} \times 100$$

L'activité anti-collagénase de l'extrait à différentes concentrations a été étudiée dans un modèle organotypique de peau humaine.

En absence de collagénase (témoin véhicule), les fibres de collagène étaient intactes. En présence de collagénase (témoin enzyme), les fibres de collagène  
5 étaient presque totalement dégradées). Ce résultat était attendu et validait l'essai.

Le phosphoramidon à  $10^{-3}$  M, utilisé comme produit de référence, inhibait de 16% l'activité de la collagénase. Ce résultat était attendu et finissait de valider l'essai.

L'éthanol, utilisé comme diluant intermédiaire des produits à l'essai a été  
10 testé à 0,1 et 1 % (v/v). Il n'avait pas d'effet sur la dégradation des fibres de collagène par la collagénase.

L'extrait peptidique testé à 0,01; 0,1 et 1 % (p/v) inhibait l'activité de la collagénase de 2, 24 et 65 % respectivement L'observation morphologique aboutissait au même résultat.

15 En conclusion, dans les conditions expérimentales retenues, l'extrait peptidique A présentait à des concentrations faibles une activité anti-collagénase importante.

Les résultants d'inhibition de l'extrait peptidique, de l'éthanol et du phosphoramidon sur la digestion des fibres de collagène dermiques par la  
20 collagénase sont réunis dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4

Condition expérimentale	Concentration	Digestion enzymatique (observation morphologique)	% d'inhibition de l'activité collagénase (analyse d'image)
Témoin véhicule	-	0	-
Témoin enzyme	50 UI/ml	+++	0
Phosphoramidon (M)	$10^{-3}$	+	+
Ethanol	0,1	+++	0
(%, v/v)	1	+++	0
Extrait peptidique	0,01	+++	2
(%, v/v)	0,1	++	24
	1	+	65

0 : digestion enzymatique nulle

+: digestion enzymatique faible

5 ++ : digestion enzymatique moyenne

+++ : digestion enzymatique forte

#### V – Activité anti-métalloprotéase MMP-2 et MMP-9 des peptides de lupin – extraits

##### A, B et C

- 10 La MMP-2 ou gélatinase A et la MMP-9 ou gélatinase B sont des métalloprotéases qui dégradent des composants spécifiques de la matrice extracellulaire: la MMP-2 dégrade la gélatine (=collagène dénaturé), les collagènes I, IV, VII et XI, la fibronectine, la laminine et l'élastine ; la MMP-9 dégrade la gélatine, les collagènes IV, V et XIV et l'élastine. Elles jouent un rôle important
- 15 dans le « photo-aging » et dans la prolifération des cellules endothéliales.

L'activité anti-MMP-2 et anti-MMP-9 des produits à l'essai a été mesurée *in vitro* dans un modèle biochimique de type screening reposant sur l'utilisation d'une MMP-2 humaine purifiée et d'une MMP-9 humaine recombinante et du substrat de ces dernières, la gélatine conjuguée à la fluorescéine (kit EnzChek™

- 20 Gelatinase/Collagenase, MOLECULAR PROBES).

La MMP-2 purifiée à partir de fibrosarcome humain provenait de chez BOEHRINGER MANNHEIM.

La MMP-9 humaine recombinante provenait de chez R&D SYSTEMS.

La DQ-gélatine purifiée à partir de peau porcine et conjuguée à la fluorescéine était fournie dans le kit EnzChek™ Gelatinase/Collagenase (MOLECULAR PROBES).

Le tampon de réaction pour l'étude de l'activité de la MMP-2 (TpR1) était constitué de 50 mM de Tris-HCl, de 0,05% (p/v) de Triton X100 et de 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5.

Le tampon de réaction pour l'étude de l'activité de la MMP-9 (TpR2) était constitué de 50 mM de Tris-HCl, de 0,05% (p/v) de Brij 35 et de 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4.

#### Préparation des produits à l'essai et du produit de référence

La 1,10-phénanthroline a été solubilisée dans les tampons de réaction TpR1 et TpR2. Elle a été testée à 8 et 80 µg/ml.

Les extraits peptidiques A, B et C ont été solubilisés dans les tampons de réaction TpR1 et TpR2. Ils ont été testés à 0,01; 0,1 et 1% (p/v).

#### 20 MMP-2

Avant son utilisation, la MMP-2 a été activée par une incubation de 30 minutes à 37°C en présence de APMA dilué à 2,5 mM dans le tampon TpR1.

Les dilutions des produits à l'essai ou du produit de référence ont été incubées avec la DQ-gélatine, diluée à 25 µg/ml, et la MMP-2 activée, diluée à 1,25 µg/ml, pendant 24 heures à 37°C.

Un témoin, correspondant au mélange « MMP-2 + DQ-gélatine », a été incubé en parallèle.

Pour chaque condition expérimentale, des échantillons, appelés par la suite « échantillons sans enzyme », ont été incubés en présence de DQ-gélatine et en absence de MMP-2 activée. Ces échantillons permettaient de mesurer l'interférence des produits à l'essai avec la méthode d'évaluation des effets (fluorimétrie).

Chaque condition expérimentale a été réalisée en triplicate.

MMP-9

Les dilutions des produits à l'essai ou du produit de référence ont été incubées avec la DQ-gélatine, diluée à 25  $\mu$ g/ml, et la MMP-9, diluée à 0,25  $\mu$ g/ml, pendant 24 heures à 37°C.

- 5 Un témoin, correspondant au mélange « MMP-9 + DQ-gélatin », a été incubé en parallèle.

Pour chaque condition expérimentale, des échantillons, appelés par la suite « échantillons sans enzyme », ont été incubés en présence de DQ-gélatine et en absence de MMP-9. Ces échantillons permettaient de mesurer l'interférence des produits à l'essai avec la méthode d'évaluation des effets (fluorimétrie).

Chaque condition expérimentale a été réalisée en triplicate.

- 15 Après 24 heures, le signal correspondant à la dégradation de la DQ-gélatine a été mesurée en fluorimétrie (Excitation : 485 nm et émission : 595 nm). Pour chaque échantillon, la valeur obtenue pour les 'échantillons sans enzyme' a été soustraite.

Les résultats ont été exprimés en unité de fluorescence par échantillon et en pourcentage de variation par rapport au groupe témoin.

- 20 Les groupes de données (groupe témoin et groupes traités) ont été comparés par une analyse de la variance à un facteur (ANOVA 1,  $p < 0,05$ ), suivie par un test de Dunnett.

Les résultats sont indiqués ci-dessous :

V.1 – Activité anti-MMP-2

Extrait peptidique	Témoin	Activité MMP-2 (en %) (1) / Concentration (% v/v) en solution d'extrait peptidique à 10 % en poids		
		0.01	0.1	1
C	100	119	111	43
A	100	152	151	68
B	100	110	98	77

- 25 (1) Activité exprimée par rapport au groupe témoin en absence d'inhibiteur de la MMP-2

### Conclusion

- La solution à 10 % en poids d'extrait de lupin C, testée à 0,01 et 0,1 % (v/v) ne présente pas d'activité anti-MMP-2. Testée à 1 % (v/v), elle inhibe la MMP-2 de 57 %.
- La solution à 10 % en poids d'extrait de lupin A, testée à 0,01 à 0,1 % (v/v) ne présente pas d'activité anti-MMP-2. Testée à 1 % (v/v), elle inhibe la MMP-2 de 32 %.
- la solution à 10 % en poids d'extrait B, testée à 1 % inhibe à 23 % MMP-2.
- La phénanthroline, testée à 8 et 80 µg/ml, inhibe de 32 et 73 % respectivement l'activité de la MMP-2. Ce résultat qui était attendu valide l'essai.

### V.2 – Activité anti-MMP-9

Extrait peptidique	Témoin	Activité MMP-9 (en %) (1) / Concentration (% v/v) en solution d'extrait peptidique à 10 % en poids		
		0.01	0.1	1
A	100	143	143	61
B	100	146	129	27

- (1) Activité exprimée par rapport au groupe témoin en absence d'inhibiteur de la MMP-9

### Conclusion:

- La solution à 10 % en poids d'extrait de lupin A, testée à 0.01 et 0.1 % (v/v) ne présente pas d'activité anti-MMP-9. Testée à 1 % (v/v), elle inhibe la MMP-9 de 39 %.
- La solution à 10 % en poids d'extrait de lupin B, testée à 0.01; 0.1 % (v/v) ne présente pas d'activité anti-MMP-9. Testée à 1 % (v/v), elle inhibe la MMP-9 de 73%.

La phénanthroline, testée à 8 et 80 µg/ml, inhibe de 80 et 76 % respectivement l'activité de la MMP-9. Ce résultat qui était attendu valide l'essai.

### REVENDECATIONS

1. Extrait peptidique de lupin (*lupinus*) caractérisé en ce qu'il présente une activité d'inhibition des métalloprotéases.
- 5
2. Extrait peptidique de lupin selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente une activité d'inhibition des métalloprotéases choisies entre autre parmi les collagénases, les gélatinases.
- 10
3. Extrait peptidique de lupin selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est appauvri en lipide.
4. Extrait peptidique de lupin selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 70 %, de préférence au moins 80 % de peptides.
- 15
5. Extrait peptidique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est obtenu par hydrolyse de la fraction protéique de lupin.
6. Extrait protéique de lupin selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant les étapes suivantes :
- 20
- préparation d'un tourteau de lupin délipidé et broyé ou d'une farine de lupin (lipidée), micronisée,
  - extraction des fractions protéiques et osiques solubles, ou précipitation des protéines au point isolélectrique,
  - éventuellement séparation de la fraction protéique,
  - hydrolyse de la fraction protéique et récupération éventuellement, après filtration, de l'extrait protéique.
- 25
7. Extrait peptidique selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il présente la composition en acides aminés suivantes (en pourcentage en poids par rapport au poids total d'acides aminés) :
- 30

Amino-acides	%/AA totaux
ASP	11,3
GLU	23,2
SER	5,1
HIS	1,7
GLY	3,4
THR	3,2
ALA	2,8
ARG	10,3
TYR	6,1
CYS-CYS	2,4
VAL	3,8
MET	0,2
PHE	7,0
ILE	3,3
LEU	7,9
LYS	3,7
PRO	4,4

8. Composition pharmaceutique ou cosmétique ou nutraceutique comprenant un extrait peptidique selon l'une des revendications 1 à 7, éventuellement un  
5 véhicule inerte, notamment pour le traitement d'humains ou de mammifères souffrant d'une condition ou d'une maladie liée à une destruction excessive de collagène ou à une destruction excessive des macroprotéines de soutien par des métalloprotéases.

10 9. Composition selon la revendication 8, pour le traitement de l'arthrose, de maladies parodontales, de lésions de la peau, de maladies inflammatoires, des maladies liées au défaut de cicatrisation, à l'attaque de l'émail des dents, l'angioénèse anormale ou maline (tumorale).

10. Composition selon la revendication 9, pour le traitement des lésions de la peau dues au vieillissement intrinsèque de la peau, le vieillissement sous l'action du rayonnement solaire, les effets délétères du tabac, de la pollution, du stress.

5 11. Composition selon la revendication 10, pour une application topique externe.

12. Composition selon la revendication 8, 9 ou 10, pour une administration orale.

10

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

2792202  
N° d'enregistrement  
national

FA 574551  
FR 9904875

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	M. RADLOWSKI ET AL.: "SYSTEMIN-AN INDUCER OF PROTEINASE INHIBITOR SYNTHESIS CAN BE RESPONSIBLE FOR BIOLOGICAL ACTIVITY OF A LUPIN EXTRACT AGAINST INSECTS." JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY., vol. 150, 1997, pages 220-223, XP000866580 FISCHER, STUTTGART., DE ISSN: 0176-1617 * le document en entier *	1
A	MARK E. HINES ET AL.: "SCREENING FOR CYSTEINE PROTEINASE INHIBITOR ACTIVITY IN LEGUME SEEDS." JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE., vol. 59, 1992, pages 555-557, XP002126982 ELSEVIER APPLIED SCIENCE PUBLISHERS. BARKING., GB ISSN: 0022-5142	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)
		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
8 février 2000		Rempp, G
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1  
EPO FORM 1803 ou 1802 (P04C13)